

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.

⑨日本国特許庁(JP)

⑩特許出願公開

⑪公開特許公報(A) 平4-103599

⑫Int. CL⁵
C 07 K 13/00
C 12 N 15/62
// A 61 K 37/02
C 12 N 15/24
15/27
C 12 P 21/02
(C 12 P 21/02
C 12 R 1:91)

識別記号

序内整理番号

⑬公開 平成4年(1992)4月6日

A B Y
A D U

7731-4H

8317-4C

H

8214-4B

K

8214-4B

Z N A

8214-4B

8717-4B C 12 N 15/00

審査請求 未請求 請求項の数 5 (全8頁)

A

⑭発明の名称 融合ポリペプチド

⑮特 願 平2-221826

⑯出 願 平2(1990)8月22日

⑰発明者 沢田律子 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

⑱発明者 成戸昌信 神奈川県鎌倉市手広1111番地 東レ株式会社基礎研究所内

⑲出願人 東レ株式会社 東京都中央区日本橋室町2丁目2番1号

明細書

1. 発明の名称

融合ポリペプチド

2. 特許請求の範囲

- (1) ヒトコロニー刺激因子のポリペプチドとヒトインテロイキン6のポリペプチドからなる融合ポリペプチド。
- (2) ヒトコロニー刺激因子が顆粒球コロニー刺激因子である請求項(1)記載の融合ポリペプチド。
- (3) 請求項(1)もしくは(2)記載の融合ポリペプチドを暗号化する遺伝子。
- (4) ヒトコロニー刺激因子を暗号化する遺伝子とヒトインテロイキン6を暗号化する遺伝子をエクソン部分ごとに連結してなる請求項(3)記載の遺伝子。
- (5) 請求項(3)もしくは(4)記載の遺伝子を有する表現ベクターにより真核細胞を形質転換させ、該形質転換体を培養させて得られる融合ポリペプチド。

3. 発明の詳細な説明

[産業上の利用分野]

本発明は、医薬品として利用しうるコロニー刺激因子とインテロイキン6との融合タンパク質に関する。

[従来の技術]

血液中には、赤血球、リンパ球、顆粒球、マクロファージ、血小板など各種の細胞が存在する。これらの各種血液細胞には寿命があり、骨髓より絶えず生産、供給されることにより恒常性を維持している。すべての血液細胞は自己複製能を有する多能性幹細胞に由来し、種々の前駆細胞を経て、成熟細胞へと増殖、分化する。この過程には種々なタンパク質の分化、増殖因子が関与している。特に、顆粒球、マクロファージの増殖と分化を促進する因子はコロニー刺激因子(以下CSFと略す)と呼ばれており、インテロイキン3、顆粒球・マクロファージCSF(以下GM-CSFと略す)、マクロファージCSF(以下M-CSFと略す)、顆粒球CSF(以下G-CSFと略す)が知られている。

その中でG-CSFは、好中球産生刺激、好中

球機能（遊走能、食食能、殺菌能など）の亢進、造血幹細胞／前駆細胞の増幅、骨髓性白血病細胞の増殖／分化の刺激などの生物作用を有する生体防御に重要な因子であり、細菌・真菌感染症の予防・治療薬、癌治療や骨髄移植に基づく顆粒球減少時の補助薬、さらに白血病自体の治療薬となる可能性がある（浅野茂隆、高久史郎（1989）。実験医学、1、191-197）。G-CSFのcDNAとその全遺伝子は、すでにクローニングされており（Nagataら、Nature、319、415-418、1986ならびにNagataら、The EMBO J.、5、575-581、1986）、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞由来（Ohedaら、J. Biochem.、103、544-548、1988）と大腸菌由来（Souzaら、Science、232、61-65、1986）の組換え型G-CSFの產生が報告されている。

一方、インターロイキン6は造血免疫系のみならず、神経系、肝細胞など極めて多方面の組織、臓器に関与する生体防御にとって重要な因子であることが明らかにされつつあり（平野俊夫、医学のあゆみ、148、301-304、1988）、医薬品、特に

—フェロンβあるいはヒトインターフェロンγ感受性の両細胞に対して抗ウィルス作用を示すことが報告されている（田中利明ら、特開昭63-267278号公報、特開昭63-267296号公報）。

癌治療時や骨髄移植時では、化学療法剤の投与や放射線照射により骨髄抑制が起こり、種々の血球系の細胞が減少する。好中球を特異的に増加させる因子として、G-CSFなどのCSFが知られている。しかしながら、骨髄抑制は同時に血小板の減少も伴なうので、インターロイキン6のような血小板增加作用のある医薬品が必要とされている。CSFは増血系の細胞だけに作用するのに対して、インターロイキン6は造血系の細胞のほかにも広範囲な細胞に作用すること（前述）が知られている。

[発明が解決しようとする課題]

本発明は、作用スペクトルの改良された、望ましくは副作用の少ない体内動態（体内分布）や安定性の改良された、またある場合には、標的細胞

癌治療や骨髄移植に基づく血小板減少時の補助薬としての期待がもたれている。このインターロイキン6を得る方法としては、培養細胞を用いる方法（Shimuzuら、J. Immunol.、134、1728-1733、1985）や、遺伝子組換え細胞あるいは微生物を利用する方法がすでに報告されている（Hiranoら、Nature、324、73-76、1986）。

最近、遺伝子工学的技法の進歩により、タンパク質を暗号化している遺伝子レベルの改変によって新規なタンパク質を得ることが容易にできるようになってきた。このような技術の進歩は、異種のタンパク質を融合させてタンパク質の取得を也可能にした。このような融合タンパク質においては、発現量の増大、作用スペクトルの拡大もしくは限定化、副作用の軽減などが期待できる。例えば、β-ガラクトシダーゼと融合させたタンパク質は大腸菌内で効率良く発現するようになる（Bressan-G.ら、Nuc. acids. Res.、15、10056、1987）。また、ヒトインターフェロンβとインターフェロンγを融合させたタンパク質は、ヒトインタ

選択性の優れた造血活性を有するCSFとインターロイキン6との融合ポリペプチドを提供することを目的とする。

[課題を解決するための手段]

本発明者らは融合ポリペプチドの作製にあたり、両タンパク質の立体構造になるべく変化を与えない方法を脱意検討し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、ヒトCSFのポリペプチドとヒトインターロイキン6のポリペプチドからなる機能的な融合ポリペプチドを提供する。

本発明におけるCSFとは、インターロイキン3、GM-CSF、M-CSF、G-CSFを指し、このいずれを用いてもかまわない。例えば、ヒトG-CSFは好中球の分化、増殖に深く関与していることが知られている。ヒトG-CSFの具体的なアミノ酸配列は、長田らの報告に記載されている（Nature、319、415-418、1986）。ヒトG-CSFを暗号化するDNAを取得する方法は、動物細胞からメッセンジャーRNA（mRNA）を調製しcDNAを合成する方法、あるいは化学

的に合成する方法があるが、いずれの方法でもよい。

また、本発明におけるインターロイキン6とは、従来BSF-2、IFN- β_2 、26Kタンパク、ハイブリドーマ／プラズマサイトーマ増殖因子、肝細胞増殖因子などの名称で呼ばれていたタンパク質を指す。ヒトインターロイキン6の具体的なアミノ酸配列は、平野らの報告に記載されている（Nature, 324, 73-76, 1986）。ヒトインターロイキン6を暗号化するDNAを取得する方法には、動物細胞からmRNAを調製しcDNAを合成する方法、あるいは化学的に合成する方法があるが、いずれの方法でもよい。

ヒトCSFとヒトインターロイキン6との融合ポリペプチドとしては、両者のフルレンジスを単につなぎ合わせたもの、両者の途中から切断したものをつけ合わせたものなどが考えられるが、いずれのポリペプチドでもかまわない。しかしながら、ヒトCSFとヒトインターロイキン6との融合ポリペプチドの設計においては、両タンパク

ば、G-CSFとインターロイキン6は第1図(a)に示すように、それぞれ5つのエクソンからなるので、エクソンごとにつなぎ合わせた場合、計30個の融合ポリペプチドが考えられる。

実際上は、G-CSFとインターロイキン6の両者とも、成熟タンパク質は第2エクソンの途中からはじまるので、成熟タンパク質に注目して、エクソン部の組み合わせによるG-CSFとインターロイキン6の融合タンパク質の種類は14通りになる。例えば、第1図(b)のような融合ポリペプチドが一例として考えられる。

従って、本発明の特徴の一つは、G-CSFとインターロイキン6の両者の分子量や基本的な構造を大きく変えることなく両者の融合ポリペプチド（場合によりキメラ蛋白質とも言われる）を規定するものであり、方法論として遺伝子のエクソン部分をブロックとしてつなぎ変えることを一つの特徴とする。

しかしながら、本発明はエクソン部同士のつなぎ換えによるG-CSFとインターロイキン6の

質の立体構造になるべく変化を与えないことが望ましい。何故なら、ヒトインターロイキン6の場合には、その活性部位はC末端側にあるにもかかわらず、N末端側の欠失により失活することが報告されており(Krüttgen,A.ら, FEBS LETTERS, 262, 323-326, 1990)、これは、その立体構造がインターロイキン6の活性発現に深く関与していることを示しているからである。

G-CSFとインターロイキン6は、そのアミノ酸配列における類似性は高くなく、またその生理作用は異なるものの、その遺伝子構造（エクソン－インtron構成）は第1図(a)に示すように酷似している(Yasukawaら, The EMBO J., 6, 2939-2945, 1987)。さらに、タンパク質の立体構造の形成に重要なシスティンの数と位置が保存されている(松田正ら, 実験医学, 1, 13-20, 1989)。従って、本発明者らは両者をエクソン部分ごとに遺伝子をつなぎ合わせれば、その遺伝子配列より転写、翻訳される融合ポリペプチドの立体構造は保持されることが期待できると考えた。例え

融合ポリペプチド（場合によりキメラ蛋白質とも言われる）に限定されるものではなく、基本的にはCSFとインターロイキン6の組み合わせによる融合ポリペプチド全体を含むものである。

ヒトCSFとヒトインターロイキン6との融合ポリペプチドを作製する方法は、各々のタンパク質を精製した後、化学的に結合させる方法あるいは融合ポリペプチドを暗号化するDNAを作製し、これを発現させることにより目的物を得る方法があるが、いずれの方法でもよい。

融合ポリペプチドを暗号化するDNAを作製する方法としては、化学的に全合成する方法、制限酵素を利用する方法、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を利用した方法(R.M.Hortonら, GEN, 17, 81-88, 1989)などがあるが、いずれの方法を用いてもよい。例えば、目的物の分子量が大きくて全合成が困難な場合、あるいは適当な制限酵素認識部位が存在しない場合には、PCR法を利用することができる。この方法は、例えばヒトG-CSFとヒトインターロイキン6の融合ポリ

ペプチドを暗号化するDNAを取得する場合、第2図に示す操作により目的物を得ることができる。まず、4種類(1~4)の15~30塩基のプライマーを作製する。太線はG-CSFと相補的な配列、細線はインターロイキン6と相補的な配列を示す。すなわち、2のプライマーはG-CSFに相補的な配列(16塩基)と3のプライマーのインターロイキン6部分に相補的な配列(9塩基)を有し、3のプライマーはインターロイキン6に相補的な配列(16塩基)と2のプライマーのG-CSF部分に相補的な配列(9塩基)を有するように設計する。点線はEcoRI酵素認識部位を含む配列を示すが、各々のポリペプチドを暗号化するDNA配列中に存在しない制限酵素認識配列を含むものならば、いずれの配列でもかまわない。

第2図に示すように、1と2のプライマーを用いてG-CSFのcDNAを、3と4のプライマーを用いてインターロイキン6のcDNAを錠型として、PCRにより断片を増幅する。次に、各

遺伝子のプロモーター、ラウス肉腫ウィルスのLTR領域、ヒトT細胞白血病ウィルスのLTR領域などが挙げられる。組換えDNAの構築に用いるベクターとしては、遺伝子工学の分野で用いられているプラスミド由来の各種ベクターが利用でき、用いる宿主中での複製のための複製開始領域を有するものを適宜選択して用いる。例えば、pSRα296(Takebe,Y.ら, Mol. Cell. Biol., 1, 468-472, 1988)が挙げられるが、これに限定されるものではない。

融合遺伝子を組み込んだ発現ベクターを真該細胞に導入し、適当な条件下で培養することにより該融合遺伝子に規定された融合ポリペプチドを得ることができる。この融合ポリペプチド生産用宿主としては、酵母、昆虫、両性類および哺乳類の細胞が利用できるが、いずれを用いてもかまわない。本発明においては、哺乳類由来の細胞、例えばハムスターCHO細胞、マウスC127細胞、サルCOS細胞などを用いることが望ましい。

哺乳類由来の細胞を宿主とした場合には、融合

々の増幅されたDNA断片を混合したものを錠型としてPCRを行なう。G-CSF由来の断片とインターロイキン6由来の断片は、第2図に示すことく18塩基の相補的な配列を有しているのでアニーリングし、各々の断片がプライマーとなり、G-CSFとインターロイキン6との融合ポリペプチドを暗号化する2本鎖DNA(融合遺伝子)が生じる。この反応に1と4のプライマーを加えることにより、目的とする融合遺伝子を増幅させることができる。この増幅された融合遺伝子は両端にEcoRI酵素切断部位を有しているので、切断後、適当なプラスミドベクターに挿入することができる。

このようにして作製した融合遺伝子発現用のプロモーター、あるいは発現をコントロールする領域としては、遺伝子工学の分野で用いられている各種のプロモーターやエンハンサーが利用できる。例えば、真該細胞での発現用としては、シミアンウィルスのSV40のプロモーター・エンハンサー、亜鉛により発現誘導可能なメタルチオネイン

ポリペプチドは細胞の培養上清中から回収することができる。さらに、各種クロマトグラフィーにより融合ポリペプチドを精製することが可能である。

[実施例]

以下に、実施例によって本発明をさらに詳しく説明する。

一般的な実験方法は、実験書 [Sambrook,J., Fritsch,E.F., Maniatis,T. (1989) "Molecular Cloning: a laboratory manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press] に従った。

実施例1

ヒトインターロイキン6遺伝子のクローニング:

インターロイキン6、G-CSFおよびGM-CSFを產生するヒト甲状腺由来細胞株NIM-1(微研癌寄第11103号)から、グアニジウムチオシアネートを用いる公知の方法により全RNAを調製し、さらにオリゴdTセルロースカラムクロマトグラフィーを用い、公知の方法に従ってmRNA 1μgを精製した。このmRNA 1μgを

材料に、公知の方法を利用したcDNA合成キット（ベーリンガー社製）を用いて2本鎖のcDNAを合成した。次に、以下に示すようなEcoRI切断部位を含む、インターロイキン6のN末端およびC末端に相当する部分を暗号化する合成オリゴマーを作製した。

5'-CCGAATTGGAGCCCCAGCTATGAACTC-3'

5'-CCGAATTGGCCCCATGCTACATTTGCC-3'

合成オリゴマーは、自動DNA合成装置（アプライドバイオシステム社製）を用いて合成した後、逆相HPLCにより精製したもの用いた。これらをプライマーとし、合成したcDNAの1/3量を用いて、PCR法によりEcoRI切断部位を両端に保持するインターロイキン6cDNAを増幅した。PCR反応液の組成は既報（Saiki.R.K.ら. Science 239, 487-491 (1988)）に従った。反応は、DNAサーマルサイクラーDJ1000（バーキンエルマーシータス社製）を用い、熱変性94℃1分間、アニーリング50℃2分間、伸長反応72℃3分間の条件で、40サイクル反応

NAはその3'側に、ベクターはcDNA挿入位置の5'側にPstI部位があり、インターロイキン6cDNAが正しい向きに入っている場合、約500bpのバンドが検出されることとなる。このような方法により、インターロイキン6cDNAを正しい方向に挿入した発現プラスミドpSRαIL6を選び出した。

実施例3

G-CSF/インターロイキン6融合遺伝子の作製：

G-CSF/インターロイキン6融合遺伝子を、PCR法（前述文献）を利用して第1回に示すような手順で作製した。まず、以下に示すようなG-CSFあるいはインターロイキン6の一部を暗号化する合成オリゴマーを作製した。

G-101: 5'-CCGAATTCAGACCCCATGGCTGGACC-3'

G-102: 5'-GTTACATGTCAGCTTCTCCTGGAGC-3'

G-101: 5'-GAGAACCTGACATGTAACAAGACTA-3'

G-102: 5'-CCGAATTGGCCCCATGCTACATTTGCC-3'

上記4種のオリゴマーは各々第3回に示す部分

を繰り返した。得られた反応混合物をフェノール／クロロホルム抽出2回、クロロホルム抽出1回した後、EcoRI消化した。このDNAを低融点アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、目的の約570bpのDNA断片を分取した。

実施例2

動物細胞発現ベクターへの導入：

pSRα296 (Takebe.Y.ら. Mol. Cell. Biol. 4, 466-472, 1988)をEcoRI消化後、BAP (Bacterial alkaline phosphatase)処理により5'末端を脱磷酸化し、これと実施例1で得られたインターロイキン6cDNAを混合、T4DNAリガーゼを用いて連結した後、E. coli HB101を形質転換した。得られたアンビシリン耐性を示す形質転換株を培養、アルカリ抽出法によりプラスミドDNAを調製した。インターロイキン6cDNAがベクターに正しい向きで挿入されたクローンを選ぶため、調製したDNAをPstIで消化、アガロースゲル電気泳動によりDNAを分離した。インターロイキン6cD

のプライマーを示し、下線はEcoRI制限酵素切断部位を示す。

合成オリゴマーは、自動DNA合成装置（アプライドバイオシステム社製）を用いて合成した後、逆相HPLCにより精製した。

ヒト甲状腺由来細胞株NIM-1（前述）から公知の方法によりクローニングしたG-CSF cDNAを大腸菌の発現ベクターpUC19に挿入した。クターpUC19G-CSF50ngを誘型とし、上記G-101とG-102をプライマーとし、PCR法（前述文献）によりヒトG-CSFの第1エクソンと第2エクソン(Nagata.S.ら. The EMBO Journal. 5, 575-581, 1986)部分と、そのN末端側にEcoRI切断部位、C末端側にヒトイントロイキン6の第3エクソンの3アミノ酸(Thr-Cys-Asn)をコードする遺伝子配列(Yasukawa.K.ら. The EMBO Journal. 6, 2939-2945, 1987)を有する約200bpのDNAを増幅した。一方、ヒトイントロイキン6を挿入したベクターpSRαIL6（実施例2）50ngを誘型

とし、上記6-101と6-102をプライマーとして、PCR法（前述文献）によりヒトインターロイキン6の第3、第4、第5エクソン（前述文献）部分と、そのN末端側にG-CSFの第2エクソンの3アミノ酸(Glu-Lys-Leu)をコードする遺伝子配列（前述文献）と、C末端側にEcoRI切断部位を有する約430bpのDNAを増幅した。PCR反応液(100μl)の組成は既報（前述文献）に従った。反応は、DNAサーマルサイクラー(DJ-1000)（前述）を用い、熱変性94℃で1分間、アニーリング55℃2分間、伸長反応72℃で3分間の条件で、40サイクル反応を繰り返した。それぞれの反応生成物について低融点アガロースゲル電気泳動を行ない、目的の長さのDNAが得られたことを確認した。

次に、これらの反応生成物各2μlを混合したものを持ちとし、上記G-101と6-102をプライマーとし、PCR法（前述文献）によりヒトG-CSF/インターロイキン6の融合タンパク質をコードする約630bpのDNAを増幅した。

NAをHindIIIとXbaIの二重消化あるいはPstIで消化し、低融点アガロースゲル電気泳動により解析を行なった。このような方法によりG-CSF/インターロイキン6融合遺伝子を正しい方向に挿入した動物細胞発現ベクターpSR-aG-6Aを選び出した。

実験例5

COS-1細胞を宿主としたG-CSF/インターロイキン6融合タンパク質の一過性の発現

実験例4で作製したpSR-aG-6AをサルCOS-1細胞に導入し、一過性の発現を調べた。10%牛胎児血清(FCS)を含むダブルコート法イーグル培地(DMEM)に懸滴させたCOS-1細胞(CRL-1650)を、3.5×10⁵個/5mlテラス6穴プレート(コニング社、25810-6)にシードイングし、37℃、5%CO₂存在下、一晩培養を行なった。このCOS-1細胞の培地を抜き取り、10%ニューセラム(コラボレイティブ社製)2μg/プラス1mlDNA=100μMクロロキノン、DEAE二

反応は、熱変性94℃で1分間、アニーリング55℃2分間、伸長反応72℃で3分間の条件で、40サイクル反応を繰り返した。得られた反応混合物をフェノール/クロロオルム抽出2回、クロロオルム抽出1回した後、EcoRI消化したこのDNAを低融点アガロースゲル電気泳動を用いて分離し、目的の約630bpのDNA断片であるG-6A(第1図(b))を得た。

実験例4

融合遺伝子の動物細胞発現ベクターへの導入

実験例2で使用したEcoRI消化後5'末端を脱磷酸化したpSR-a296と、実験例3で得られたG-CSF/インターロイキン6融合遺伝子断片を混合、T4DNAリガーゼを用いて連結した後、E.coli MC1061株を形質転換した。得られたアンビソリ耐性を示す形質転換株を培養、アルカリ抽出法によりプラスミドDNAを調製した。G-CSF/インターロイキン6融合遺伝子がベクターに正しい向きで挿入されたクローンを選ぶため、調製したプラスミドD

テキストラン400μg/mlの溶液1mlを加入、37℃、5%CO₂条件下で4時間トランスフェクションした後、液を抜き取り、10%ジメチルスフレホキシトを含むPBS 1mlを加入、2分間静置した。細胞をDMEMで2回洗った後、10%FCSを含むDMEMを加入、2日間培養し、培地を交換した後、さらに3日間培養して得られた上清をG-CSF/インターロイキン6融合タンパク質標品とし、活性を測定した。

実験例6

バイオアッセイ法によるインターロイキン6活性の検出

10%FCS:5×10⁻⁵M 2-メルカプトイソノールを含むRPMI1640培地に、既吸光度記した実験例5で得られた試料液を加えたら0μlとして96穴プレート(細胞培養用)に入れる。各ウェルに2×10⁴個/50μlの7T-D1細胞(インターロイキン6感受性細胞株)を加え、37℃、5%CO₂存在下で3日間培養

Dasseur (1987). J. Exp. Med. 165: 914-919

する。5 μg/ml MTT 10 μl を各ウェルに加え 5 時間培養後、150 μl の 0.04 N 塩酸-イソプロパノールを加えて細胞を溶解後、570 nm の吸収を測定した。標準インターロイキン6としては天然型インターロイキン6を用いた。この結果、培養上清中に約 3.7 μg/ml のインターロイキン6活性を認めた。

【発明の効果】

本発明により得られたCSF/インターロイキン6融合ポリペプチドは、各々の持つ生理作用およびスペクトルの改良されたものと期待される。その結果、癌治療時や骨髓移植時の好中球およびもしくは血小板減少の回復が期待できる。

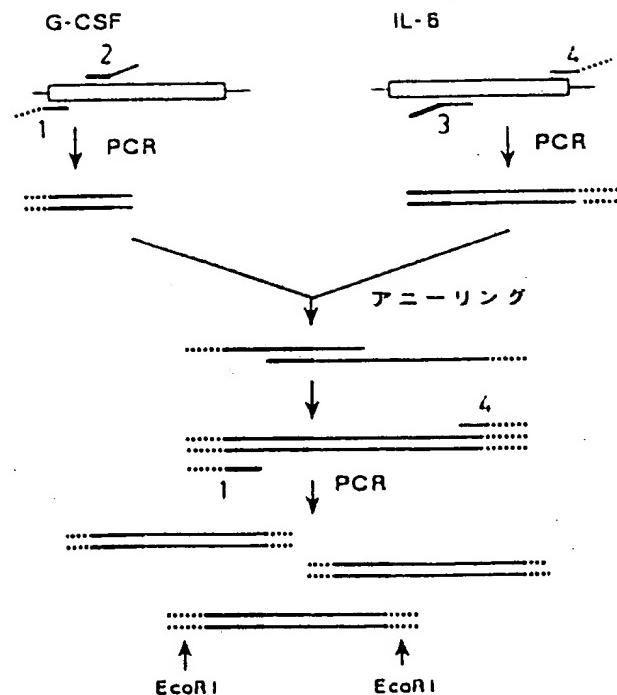
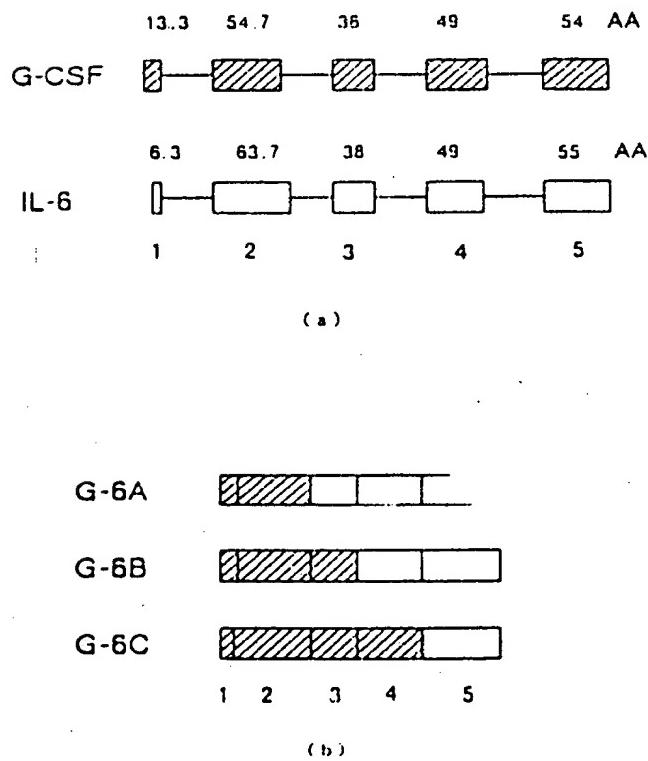
4. 図面の簡単な説明

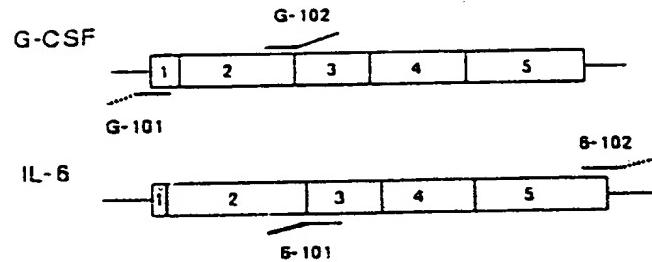
第1図はG-CSFとインターロイキン6の遺伝子構造を示すものであり、(a)は各々のエクソン構成を示し、(b)は融合ポリペプチドの一例のエクソン構成を示す。

第2図は本発明の融合ポリペプチドを暗号化する遺伝子の作製方法の一例を示し、第3図は実施

例3の融合遺伝子の作製方法を示す。

特許出願人 東レ株式会社





3 12